

李 博, 赵吉祥, 陈杖榴, 等. 三氮脒在猪血浆的药物-蛋白结合研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 24-27.

三氮脒在猪血浆的药物-蛋白结合研究

李 博, 赵吉祥, 陈杖榴, 路文华, 韩可可, 徐 维, 陈 红

(华南农业大学 兽医学院/国家兽药残留基准实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究三氮脒临床用药的有效性和安全性,测定猪血浆的药物-蛋白结合率。【方法】血浆样品以超滤法分离游离型的药物.以高效液相色谱-紫外法测定药物含量,计算出三氮脒-血浆蛋白结合率.6头猪交叉分别按体质量肌内注射7和14 mg/kg三氮脒注射液,在给药后3、5、15、60 min测定体内三氮脒-血浆蛋白结合率。【结果和结论】体外测定的三氮脒-血浆药物蛋白结合率为74.68%~95.90%。猪给药后体内的药物蛋白结合率为84.11%~89.69%(7 mg/kg剂量组),82.96%~88.65%(14 mg/kg剂量组),随着剂量增加可能出现饱和现象.在设计三氮脒应用于猪的给药方案时应充分考虑这一因素。

关键词:三氮脒; 药物-蛋白结合; 猪血浆

中图分类号:S859.79

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2014)02-0024-04

Drug-protein binding of diminazene in swine plasma

LI Bo, ZHAO Jixiang, CHEN Zhangliu, LU Wenhua, HAN Keke, XU Wei, CHEN Hong

(College of Veterinay Medicine, South China Agricultural University/National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】A study on the diminazene-protein binding rate in swine was carried out in this experiment for further clinical application efficiency and safety.【Method】The plasma samples were pretreated to separate free drug by ultrafiltration. A high performance liquid chromatographic-UV (HPLC-UV) method was used to measure the amount of free diminazene in plasma. Then the drug-protein binding rate was accounted. Six swine were administrated intramuscularly at a dosages of 7 and 14 mg/kg. The plasma samples were collected and the protein binding rates *in vivo* were determination at 3, 5, 15, 60 min.【Result and conclusion】Diminazene-protein binding rate tested *in vitro* was within the range of 74.68% - 95.90%. Although the drug-protein binding rate *in vivo* was within the range of 84.11% - 89.69% (7 mg/kg, i. m.), and 82.96% - 88.65% (14 mg/kg, i. m.) after administration, and saturation phenomenon emerged as dosage increased. These factors should be considered in clinical regimens designing.

Key words: diminazene; drug-protein binding; swine plasma

三氮脒是用于家畜的抗血液原虫药,主要治疗锥虫病、巴贝斯梨形虫病、泰勒梨形虫病和马媾疫锥虫病等.我国属锥虫病疫区^[1-3],家畜锥虫病较为常见,三氮脒在临床治疗中有重要的应用价值.锥虫的宿主特异性不严格^[4].近几十年随着世界范围内养猪业的发展,有关猪感染、发生锥虫病的报道逐渐增

多^[5-13],使用三氮脒治疗猪锥虫病的报道也有增加.但是国内有关三氮脒的药理学和毒理学研究较少.从已有的报道来看,本药的药动学特征在不同动物种属间有较大差异,安全范围小,耐受剂量在种属间和个体间差异大,临床常见中毒反应,一般为副交感神经兴奋样症状^[14].因此,以猪为靶动物开展药理学

收稿日期:2013-06-06

优先出版时间:2014-01-03

优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140103.0834.035.html>

作者简介:李 博(1988—),男,硕士研究生,E-mail:libo123321110@163.com;通信作者:陈 红(1969—),女,高级兽医师,E-mail:shuyi@scau.edu.cn

基金项目:2009年农业行业标准制定“动物性食品中三氮脒残留量的测定”(农财发[2009]105号)

和毒理学研究,是兽医临床安全有效用药、有利于消费者的健康安全的重要基础研究.在牛、羊、犬的研究显示,三氮脒的血浆蛋白结合率较高^[14-16].药物与机体蛋白质结合,形成可逆的药物-蛋白复合物,对药物的跨膜转运、发挥治疗作用或是引起不良反应和体内代谢过程都有重要影响.药物的血浆蛋白结合情况与动物种属间遗传上的差异有关.研究药物在特定动物的蛋白结合情况可以解释一些药动学特征(如排泄缓慢);也可以预测当非蛋白结合型(游离)药物浓度增加时(由机体蛋白质代谢异常、竞争性结合的存在或者用药量过高导致的),可能出现较强的治疗作用或中毒反应骤增的现象.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:美国 Dionex 公司, Ultimate 3000 系列,配备自动进样器,四元泵,在线脱气泵,柱温箱,色谱工作站软件.色谱分析柱:Hypersil BDS C₁₈, 5 μm, 250 mm × 4.6 mm, 美国 Thermo 公司.离心机:Mach 1.6 R 冷冻型,美国 Thermo 公司.超滤管:Millipor, UFC501024, 0.5 mL.

三氮脒标准品为 Sigma 公司产品,质量分数为 90% (以 C₁₄H₁₅N₇ · 2C₄H₇NO₃ 计).乙腈、甲醇为色谱纯, Mallinckrodt Bator 公司产品.冰乙酸、三乙胺、辛烷磺酸钠均为国产分析纯试剂.三氮脒粉针剂:批号 12083, 三氮脒质量分数为 100% (采用 HPLC 法,与三氮脒标准品比较,测得实际质量分数为 96%), 兰州正丰制药有限责任公司产品.

1.2 溶液配制

三氮脒标准储备液:准确称取三氮脒标准品 (C₁₄H₁₅N₇ · 2C₄H₇NO₃) 101.9 mg 于 50 mL 棕色容量瓶中,用超纯水溶解并定容至刻度,摇匀即得 1 000 μg/mL 的三氮脒标准储备液(以 C₁₄H₁₅N₇ 计),密封,于 4 °C 冰箱保存备用,有效期 1 个月,临用前以超纯水稀释成系列标准工作溶液.0.005 mol/L 辛烷磺酸钠溶液:称取 1.08 g 的辛烷磺酸钠,于 1 000 mL 容量瓶内用超纯水溶解定容;此溶液转移至 1 L 试剂瓶中,添加 1 mL 三乙胺,用冰乙酸调节 pH 至 3.2,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后备用.三氮脒注射液:取适量三氮脒粉针剂,用灭菌生理盐水配成 70 mg/mL 的注射液,临用现配.

1.3 血浆中游离药物分离方法

取 0.5 mL 血浆样品,加入 Millipor 超滤管中,在 37 °C 以 2 700 r/min 离心 20 min,取 50 μL 超滤液用高效液相色谱-紫外法(HPLC-UV)分析药物含量.

1.4 药物含量的 HPLC-UV 分析法

紫外检测波长 372 nm.流动相 V(乙腈):V(pH 3.2 的 0.005 mol/L 辛烷磺酸钠溶液) = 30:70;流速

1.000 mL/min.柱温:24.0 °C,进样量 50 μL.外标法标准曲线定量.

游离三氮脒血药浓度标准曲线制备:取适量 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液,稀释不同质量浓度的三氮脒系列工作溶液,使三氮脒的质量浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 μg/mL.按前述 HPLC-UV 条件分析.以药物响应信号的峰面积为 x ,以相应药物质量浓度为 y 作直线回归,求得标准曲线方程和相关系数.

1.5 血浆药物总浓度(蛋白结合型药物与游离型药物之和)的测定

参考赵吉祥^[17]建立的猪血浆样品三氮脒浓度测定的高效液相色谱法,用乙二胺四乙酸二钠溶液稀释猪血浆样品,用 SEP-PAK-C₁₈ 固相萃取小柱富集全部药物(包括蛋白结合型药物和游离型药物),再以含有离子对试剂的乙腈洗脱.以氮气吹干洗脱液,流动相复溶后取 50 μL 按“1.4”HPLC-UV 法测定药物含量.外标法标准曲线定量.

三氮脒血药浓度标准曲线制备:取适量空白猪血浆样本,添加不同质量浓度的三氮脒系列工作溶液适量,按前述方法处理后,按“1.4”HPLC-UV 法测定药物含量.以药物响应信号的峰面积为 x ,以相应药物质量浓度为 y 作直线回归,求得标准曲线方程和相关系数.猪血浆中三氮脒质量浓度在 0.01 ~ 40.0 μg/mL 范围内可准确定量;血浆中三氮脒质量浓度为 0.05、0.50、10.00 μg/mL 时,相对回收率 ≥ 89.09%,变异系数在 0.41% ~ 0.81% 之间.猪血浆中三氮脒的定量限为 5 ng/mL,检测限为 2 ng/mL.

1.6 体外测定猪血浆三氮脒-蛋白结合率的方法

空白猪全血样本采自临床健康、未使用任何药物和饲料添加剂的大三元杂交猪,经抗凝和离心后,即为空白猪血浆样品.

参照宋粉云^[18]的方法,取适量的三氮脒标准工作液加入空白猪血浆中,混匀,制得药物质量浓度为 0.05、0.50、10.00 μg/mL 的 3 个不同质量浓度血浆样品,每个质量浓度样品各 5 份.样品在 37 °C 避光孵育 1 h 后,取 0.5 mL,加入 Millipor 超滤管中,在 37 °C 以 2 700 r/min 离心 20 min,取超滤液 50 μL 按“1.4”HPLC-UV 法分析药物含量.

按照公式(1)计算药物的血浆蛋白结合率:

$$\text{三氮脒-血浆蛋白结合率} = \frac{\text{血浆药物总质量浓度} - \text{游离药物质量浓度}}{\text{血浆药物总质量浓度}} \times 100\% \quad (1)$$

1.7 动物给药试验

6 头健康的杜洛克 × 长白 × 约克夏杂交猪,公母各半,约 10 周龄,体质量 (23.5 ± 2.2) kg,购自广东省良种猪场.常规饲养,自由饮水和采食.试验前观

察2周,临床健康.随机分成2组,按体质量分别以7和14 mg/kg 肌内注射三氮脒注射液.给药后,分别在3、5、15、60 min 经前腔静脉采血.按随机交叉进行不同剂量给药,时间间隔为10 d.

全血样品经肝素抗凝、离心分离血浆.血浆样品分别按“1.3”、“1.4”和“1.5”处理并测定游离药物质量浓度和血浆药物总质量浓度,按照公式(1)计算三氮脒-血浆蛋白结合率.不同给药剂量间的药物-血浆蛋白结合率数据采用统计学软件 SPSS 分析.

2 结果与分析

2.1 样品处理和 HPLC-UV 方法的特异性

试验获得的色谱图见图1~图4.对比图1~图3可见,在“1.4”的色谱条件下,三氮脒的保留时间是5.2 min,在目标药物峰附近无杂质干扰,血浆样本的内源性杂质与三氮脒信号分离良好.

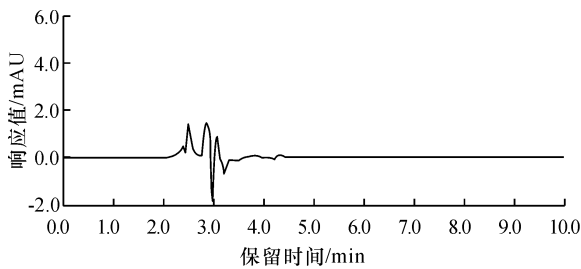


图1 空白血浆超滤液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the blank swine plasma pretreated by ultrafiltration

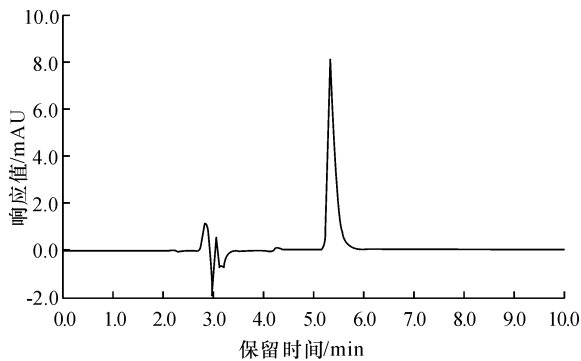


图2 0.50 μg/mL 三氮脒标准溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of diminazene standard solution 0.50 μg/mL

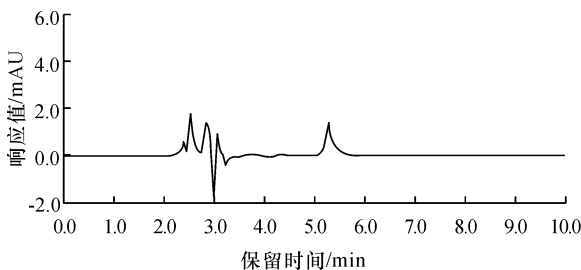


图3 空白血浆添加三氮脒至0.50 μg/mL的超滤液色谱图

Fig. 3 Chromatogram of the blank swine plasma spiked with diminazene at 0.50 μg/mL, pretreated by ultrafiltration

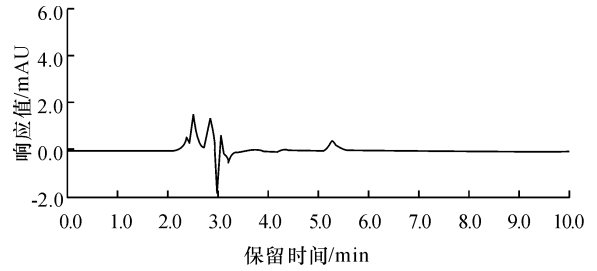


图4 以7 mg/kg 剂量给药60 min后猪血浆样品超滤液色谱图

Fig. 4 Chromatogram of swine plasma sample after administration at 7 mg/kg, 60 min, pretreated by ultrafiltration

2.2 猪血浆三氮脒-蛋白结合率

体外测定三氮脒-血浆蛋白结合率为74.68%~95.90%,详见表1.

动物给药试验获得的猪体内药物-血浆蛋白结合率见表2.猪以7和14 mg/kg 剂量肌内注射三氮脒,体内的药物蛋白结合率分别为84.11%~89.69%和82.96%~88.65%.

药物的蛋白结合率在体内、体外试验中都很高.但高剂量组(14 mg/kg),注射后5 min(接近达峰时间 t_{max})血浆样品的蛋白结合率却显著低于相同时间点低剂量组样品,差异极显著($P < 0.01$).

表1 体外测定的三氮脒-血浆蛋白结合率¹⁾

Tab. 1 Diminazene-protein binding rate tested *in vitro*

血浆药物总质量 浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	游离药物质量 浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	三氮脒-蛋白 结合率/%
0.05	0.012 ± 0.001	74.68 ± 1.49
0.50	0.020 ± 0.004	95.90 ± 0.80
10.00	0.970 ± 0.120	90.23 ± 1.16

1)表中数据为平均值±标准差, $n=6$.

表2 猪以7和14 mg/kg 剂量给药后三氮脒-血浆蛋白结合率¹⁾

Tab. 2 Diminazene-protein binding rate at two dosages (7, 14 mg/kg) tested *in vivo*

采样时间/min	7 mg/kg 剂量组	14 mg/kg 剂量组
3	85.91 ± 7.29	88.11 ± 4.81
5	89.69 ± 4.02	$82.96 \pm 3.19^{**}$
15	88.57 ± 6.50	88.65 ± 3.05
60	84.11 ± 5.70	87.83 ± 2.76

1)表中数据为平均值±标准差, $n=6$,同行数据后“**”表示组间差异极显著($P < 0.01$, Levene's 法).

3 讨论与结论

3.1 血浆中结合型药物和游离药物的分离方法

宋粉云等^[18]认为,采用超滤法时,离心时间应尽量短,温度也对结果产生影响,超滤过程一般应选择

接近恒温动物体温的 37 °C. 本试验结合超滤管的使用说明,对离心时间、转速(离心力)等进行了比较,最后选择了 37 °C 以 2 700 r/min 离心 20 min 的超滤方法.

3.2 动物给药试验的剂量选择

目前,我国 2010 版《兽药使用指南》仅规定了牛、羊、马等动物的剂量和给药方案. 国外有人对临床感染发病猪采用不同剂量治疗的疗效作了比较. 如 Jibike 等^[19]用剂量 7 mg/kg 的三氮脒治疗猪锥虫病,给药后 17 d 猪锥虫病复发. Waiswa^[7]分别用 7 和 14 mg/kg 2 个剂量的三氮脒来治疗临床猪锥虫病病例,发现经 7 mg/kg 剂量治疗的病猪在病情好转后有复发现象,而以 14 mg/kg 治疗的病猪完全治愈. 本研究结合国内外报道的临床治疗用量,将试验剂量确定为 7 和 14 mg/kg 2 个剂量水平进行观察比较.

3.3 三氮脒在家畜血浆中与血浆蛋白的结合率

Aliu 等^[15]报道了羊静脉注射 2 mg/kg 三氮脒后,药物与羊血浆蛋白结合率为 65% ~ 85%. Miller 等^[16]研究三氮脒在犬体内的药动学过程中发现,给犬肌肉注射 4.2 mg/kg 三氮脒 1 h 后,三氮脒与血浆蛋白的结合率为 75%. 血浆蛋白结合率高的药物通常消除缓慢,体内的平均滞留时间较长,这与报道^[14]中的半衰期较长相符.

本试验发现,三氮脒在体内和体外与猪血浆蛋白的结合率也很高. 以较高剂量(14 mg/kg)给药后,采自 5 min(接近达峰时间 t_{max})的血浆样品蛋白结合率为 82.96%,比低剂量组相同时间点的蛋白结合率低,差异极显著($P < 0.01$). 据此推测,三氮脒与蛋白质的结合可能存在饱和现象. 虽然猪体内各类药物结合蛋白的研究报道较少,难以进一步求得结合常数等精确数据,但已可以预测,饱和后体液内游离的药物分数增加,将提高抗虫效果,同时也会使不良反应的程度加剧. 从根本意义上看,为保障疗效和安全性,设置剂量时应考虑到其他竞争结合物的存在,以及锥虫感染可能会导致的体内蛋白质变化.

参考文献:

- [1] 陈启军. 中国锥虫病的研究概况[J]. 吉林畜牧兽医, 1991(3):4-7.
- [2] 凌英济. 家畜伊氏锥虫病流行病学调查[J]. 中国兽医科技, 1996, 9(6):17-19.
- [3] 王光雷,努素甫艾力. 中国家畜伊氏锥虫病研究进展[J]. 草食家畜,1995,2(87):52-57.
- [4] 伦照荣,张光朴. 二氟甲基鸟氨酸与贝尼尔配用治疗

实验伊氏锥虫病[J]. 中山大学学报:自然科学版, 1990, 29(4):145-149.

- [5] NG'AYO M O, NJIRU Z K, KENYAIE U, et al. Detection of trypanosomes in small ruminants and pigs in western Kenya: Important reservoirs in the epidemiology of sleeping sickness[J/OL]. Kinetoplastid Biol Dis, 2005, 4:5 (2005-07-14) [2013-05-30]. <http://www.kinetoplastids.com/content/4/1/5>.
- [6] JAMONNEAU V, RAVEL S, KOFFI M, et al. Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Côte d'Ivoire[J]. Parasitology, 2004, 129(Pt6): 693-702.
- [7] WAISWA C. Porcine trypanosomiasis in southeastern Uganda: Prevalence and assessment of therapeutic effectiveness[J]. Bulg J Vet Med, 2005, 8(1), 59-68.
- [8] SIMUKOKO H., MARCOTTY T, PHIRI I, et al. The comparative role of cattle, goats and pigs in the epidemiology of livestock trypanosomiasis on the plateau of eastern Zambia[J]. Vet Parasitol, 2007, 147(3/4):231-238.
- [9] 陈仁桃,陈仁豪,陈仁余,等. 猪伊氏锥虫病的诊治报告[J]. 养猪, 1997(1):40.
- [10] 刘九生. 猪伊氏锥虫病的诊治[J]. 四川畜牧兽医, 2000, 1(27):45.
- [11] 王永婵,孙书芳,陈保国,等. 猪锥虫病的诊断[J]. 河南畜牧兽医, 2002, 23(2):31-32.
- [12] 杨玉芬,李维召,闫信权,等. 猪伊氏锥虫病的诊治[J]. 云南畜牧兽医, 2003(4):40.
- [13] 王天奇,董发明,龙塔,等. 育肥猪伊氏锥虫病的诊断和控制[J]. 湖北畜牧兽医, 2004(2):44-45.
- [14] MILLER D B, SWAN G E, LOBETTI R G, et al. The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular and intravenous administration in the healthy dog[D]. Pretoria:University of Pretoria, 2005.
- [15] ALIU Y O, ODEGAARD S, SOGNEN E. Diminazene/berenil: Bioavailability and disposition in dairy goats[J]. Acta Vet Scand, 1984, 25(4): 593-596.
- [16] MILLER D M, SWAN G E, LOBETTI R G, et al. The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs[J]. J S Afr Vet Assoc, 2005, 76(3):146-150.
- [17] 赵吉祥. 三氮脒在健康猪的药动学研究[D]. 广州:华南农业大学, 2013.
- [18] 宋粉云. 药物分析实验[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2007:160-161.
- [19] JIBIKE G I, ANIKA S M, Treatment of experimental trypanosomiasis in pigs[J]. Br Vet J, 1991, 147(6):556-564.

【责任编辑 柴 焰】